

## ⑫公表特許公報 (A)

平5-505179

⑬公表 平成5年(1993)8月5日

⑩Int.Cl. <sup>5</sup> C 07 K 15/06 3/20	識別記号	序内整理番号 8619-4H 7731-4H 8931-4B	審査請求未請求 予備審査請求有	部門(区分) 3 (2)
		C 12 N 15/00		C※

(全 8 頁)

④発明の名称 新規フィプロネクチンレセプター

④特 願 平3-502972

④④出 願 平3(1991)1月2日

④翻訳文提出日 平4(1992)7月3日

④国際出願 PCT/US91/00048

④国際公開番号 WO91/09874

④国際公開日 平3(1991)7月11日

優先権主張 ④1990年1月5日④米国(US)④461,349

④発明者 ルオスラーテイ, エルキ アイ。 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067 ランチョ サンタ フ

④出願人 ラ ホヤ キヤンサー リサー チ ファウンデーション アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037 ラ ホヤ, ノース ト

④代理人 弁理士 山本 秀策

④指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

## 方法。

1. サブユニット $\alpha$ 、および $\beta$ 、またはそれらの免疫学的等価物を包含する、実質的に純粋な活性インテグリン。6.  $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンに対するリガンドの存在を検出する方法であって、該リガンドを含有する疑いのあるサンプルに $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンを接触させる工程、および、インテグリンに対する該リガンドの結合を検出する工程、を包含する方法。

2. フィプロネクチンおよびG R G D S P Kと結合し、ピトロネクチンとは検出され得るほどには結合しないことによりさらに特徴付けられる、クレーム1に記載の実質的に純粋な活性インテグリンのレセプター。

3.  $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物を分画する工程、該物質をG R G D S P Kを含むカラムに通す工程、および、カラム上に保持された物質を溶出する工程、を包含する方法。4.  $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物をフィプロネクチンを含むカラムで分画する工程、および、カラム上に保持された物質を溶出する工程、を包含し、該溶出物が該インテグリンを含んでいる、方法。5.  $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンの存在を検出する方法であって、該インテグリンを含有する疑いのあるサンプルに $\alpha$ 、および $\beta$ 、サブユニットに対する抗体を接触させる工程、および、該サブユニットに対する抗体の結合を検出する工程、を包含する

## 明細書

## 新規フィブロネクチンレセプター

## 発明の背景

本発明は接着ペプチドのレセプターに関し、さらに詳細には、フィブロネクチンに親和性を有する新規のレセプターに関する。

多細胞生物、例えばヒトは、およそ $10^{14}$ 個の細胞を有し、この細胞は、例えば血液細胞および神経細胞のような、少なくとも50の異なるタイプに分けられる。細胞は成長ならびに発達の過程で、他の細胞または細胞外の物質に、特異的かつ、規則的な方法で結合する。そのような細胞接着のメカニズムは、細胞の成長、移動および分化のパターンを仲介する際に重要であるようである。細胞接着メカニズムによって、細胞は特殊化した特徴、例えば筋肉細胞または肝細胞として機能するように、発達することができる。細胞接着のメカニズムはまた、脱分化および侵入に、特に、細胞が細胞自身の特殊化した形態を失い、転移ガン細胞になる場合にも、関連する。

細胞同志間の、および細胞と細胞外マトリックスとの相互作用に関するメカニズムは、十分に理解されていない。しかし、細胞表面上のまたは細胞外マトリックス内の同種のリガンドを特異的に認識し、このリガンドに結合する、細胞表面レセプターによって、仲介されると考えられている。

細胞外マトリックスに対する細胞接着およびマトリックス上への細胞の転移は、多くの場合、マトリックススタンパク質中のArg-Gly-Asp含有配列への細胞表面レセプターの結合により仲介される (RuoslahtiおよびPierschbacher, Science 238:491 (1987) に総説されている)。Arg-Gly-Asp配列は、少なくともフィブロネクチン、ビトロネクチン、種々のコラーゲン、ラミニンおよびテネイシン中では、細胞接触部位である。細胞接触部位が類似しているにもかかわらず、これらのタンパク質は、特異的なレセプターによって個々に認識され得る。

インテグリンは、Arg-Gly-Asp結合部位を介して細胞外マトリックス膜タンパク質のArg-Gly-Asp結合部位と結合する接着レセプターのファミリーである。これらは、1つの(α)および1つの(β)サブユニットからなる、ヘトロダイマー分子である。それぞれの種類にはいくつかのサブユニットが知られており、種々のαβの組み合せは、異なるリガンド特異性を持つレセプターを形成する。

これまでには、11個の区別可能なα種が、報告されている。以前は、これらは、結び付くβサブユニットに基づき、3つの主要ファミリーに分けられていた。β<sub>1</sub>サブファミリーは、フィブロネクチン、種々のコラーゲン、ラミニンおよびテネイシンのレセプターを含む。β<sub>2</sub>のサブファミリーは、白血球特異性レセプターからなり、一方、β<sub>3</sub>のサブファミリーは、一般的に、血小板グリコプロテインIIb-IIIaレセプターおよびビトロネクチンレセプターと呼ばれる多重特異的レセプタ

ーを含んでいる。存在する既知の組み合せの中で、α<sub>1</sub>サブユニットはβ<sub>1</sub>サブユニットと結合し、ビトロネクチンレセプターを形成し、また最近β<sub>1</sub>およびβ<sub>3</sub>と呼ばれる2つのβサブユニットと結び付くことが報告された。α<sub>1</sub>β<sub>1</sub>インテグリンは、ビトロネクチンおよびフィブロネクチンレセプターであるが、α<sub>1</sub>β<sub>3</sub>のリガンド特異性は知られていない。

インテグリンは、正常および異常な細胞プロセスの重要な局面の仲介に重要であるため、異なるインテグリンを同定し、特徴付ける必要がある。本発明は、この必要性を満たし、これに関連する利点を提供するものである。

## 発明の要約

本発明は、α<sub>1</sub>およびβ<sub>1</sub>のサブユニットからなることを特徴とする、実質的に純粋なインテグリン型のレセプターを提供する。このα<sub>1</sub>β<sub>1</sub>インテグリンは、フィブロネクチンおよびGRGDSPKと結合するが、ビトロネクチンとは結合しない。α<sub>1</sub>β<sub>1</sub>インテグリンは、α<sub>1</sub>β<sub>3</sub>リガンドの存在を測定するため、および種々のインテグリンに特異的な接着ペプチドを開発するために使用し得る。α<sub>1</sub>β<sub>1</sub>の存在により、細胞がフィブロネクチンに接着する能力を評価し得る。

## 図面の簡単な説明

図1は、種々の細胞タイプ上に発現したインテグリンサブユニットを示すゲルの写真である。

図2は、フィブロネクチンおよびビトロネクチンに関する細胞接着アッセイの結果を示す。エラーバーは、3つの独立したアッセイの平均値の標準偏差を示している。

## 発明の詳細な説明

本発明は、α<sub>1</sub>およびβ<sub>1</sub>サブユニットまたはそれらの免疫学的等価物からなる、新しいレセプターに関する。このインテグリン型レセプターを、本明細書では「α<sub>1</sub>β<sub>1</sub>レセプターまたは「α<sub>1</sub>β<sub>1</sub>インテグリン」と呼ぶ。このα<sub>1</sub>β<sub>1</sub>レセプターは、図1の左のパネルに示したように、α<sub>1</sub>サブユニットに対するモノクローナル抗体で免疫沈降され、そしてβ<sub>1</sub>サブユニットの予期される位置にバンドを含んでいる。

上述の免疫沈降の結果が示す、α<sub>1</sub>サブユニットとβ<sub>1</sub>サブユニットとの会合を確認するために、各サブユニットに対するモノクローナル抗体を使用して繊維芽細胞株 (fibroblast cell line) WI-38からのレセプター複合体を単離した。次に一連の抗体を用いて、同時に単離されたサブユニットを同定した。抗体α<sub>1</sub>モノクローナル抗体により精製された物質を、2つの異なる抗体β<sub>1</sub>モノクローナル抗体およびβ<sub>1</sub>の細胞質領域部位を有するペプチドに対するポリクローナル血清による免疫沈降で精製した。3つの抗体β<sub>1</sub>試薬の全てが、α<sub>1</sub>含有のインテグリンを認識した。逆に、β<sub>1</sub>モノクローナル抗体で得られた物質は、2つの異なる抗体α<sub>1</sub>モノクローナル抗体およびα<sub>1</sub>の細胞質領域部位を有するペプチドに対する、ポリクローナル

血清による免疫沈降で精製した。これらのデータは、 $\alpha$ 、および $\beta$ サブユニットが、確かに複合体を形成し会合していることを示している。

この新しい $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンのリガンド結合特異性を調べるために、アフィニティクロマトグラフィ実験および細胞接着アッセイを行なった。クロマトグラフィ実験では、 $^{125}$ IでラベルしたIMR 32 神経芽細胞(neuroblastoma cells)表面の界面活性剤抽出物を、フィブロネクチンおよびGRGDSPKペプチドアフィニティカラムで分画した。この $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンは、細胞接触部位を含むフィブロネクチンの110kdフラグメントに結合した。これは、細胞接触部位を有するペプチド(GRGDSVP)でカラムから抽出したが、関連したペプチドGGRGESVPでは溶出しなかった。引き続いてEDTA抽出を行っても、別のバンドは現れなかった。このレセプターはまた、セファロースに結合したペプチドGRGDSVPを含むカラムに結合し、GRGDSVPペプチドで溶出したが、GEGESVPペプチドでは溶出しなかった。

(以下余白)

アミノ酸を、本明細書で示す標準的な一文字の略記号によって表す。

アミノ酸	記号
アラニン	A
アスパラギン酸	D
システイン酸	C
グルタミン	Q
グルタミン酸	E
グリシン	G
ヒスチジン	H
イソロイシン	I
ロイシン	L
リジン	K
メチオニン	M
フェニルアラニン	F
プロリン	P
セリン	S
スレオニン	T
トリプトファン	W
チロシン	Y
バリン	V

抽出された物質が $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体であることを確認するために、各カラムからのピークフラクションをプールし、そして、 $\alpha$ 、および $\beta$ サブユニットに対するモノクローナル抗体で免疫沈降した。両方の抗体は、各カラムから同じ2つのバンドを沈殿させた。これは、各カラムから特異的に溶出された物質が、実際に $\alpha$ 、 $\beta$ であったことを示している。

細胞接着アッセイでは、IMR 32細胞はフィブロネクチンに結合するが、ビトロネクチン(図2)またはフィブリノーゲン(図示せず)とは結合しないことが示された。フィブロネクチンに対するこれらの細胞接着は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体によって仲介されるようである。なぜなら、検出された唯一の他のインテグリンである $\alpha$ 、 $\beta$ は、アフィニティクロマトグラフィ実験で、フィブロネクチンと結合しなかったからである(図1参照)。これらの細胞はまた、おそらく、 $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体の存在によって、コラーゲンIおよびIVおよびラミニンに結合した。

このデータは、 $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンサブユニットが会合して、機能的なフィブロネクチンレセプターを形成することを示す。多様性のスプライシングの様な変化による分子の不均一性は、完全には把握されていないが、この新しいレセプターのサブユニットは、各サブユニットに対して少なくとも3つの抗体を用いたが、 $\alpha$ 、および $\beta$ とは、免疫学的に区別できなかった。従って、電気泳動度および免疫学的反応性から判断すると、この新しいレセプターは、 $\alpha$ 、および $\beta$ サブユ

ニット、またはそれらの免疫学的等価物からなっている。

この新しい $\alpha$ 、 $\beta$ は、ビトロネクチンとは結合しないが、GRGDSPKカラムで単離し得る。このリガンド結合パターンは、以前特徴付けられたインテグリンのいずれのとも違うようである。GRGDSPKカラムと結合するこのレセプターの能力は、2つのビトロネクチン結合インテグリン、 $\alpha$ 、 $\beta$ (Pytelaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5766 (1985))および血小板レセプター $\alpha$ 、 $\beta$ (Pytelaら、Science 231:1559 (1986)(およびその中の引例)これらの文献は本明細書では参考として援用される)と共有される特性である。 $\alpha$ と最近報告された $\beta$ サブユニットとの複合体もまた、このグループに属し得る(Freedら、EMBO 8:2955 (1989)、本明細書では参考として援用される)。また別の最近報告された $\alpha$ 、( $\alpha$ 、 $\beta$ )の複合体は、フィブロネクチンおよびビトロネクチン(Cbereshら、Cell 57:59 (1989)、本明細書では参考として援用される)の両方と結合する。

$\beta$ クラス( $\alpha$ 、 $\beta$ )のフィブロネクチン結合インテグリンは、ビトロネクチンに結合せず、ここに記載した $\alpha$ 、 $\beta$ インテグリンとは異なり検出されるほどにはGRGDSPKカラムと結合しない。そのため、 $\alpha$ 、 $\beta$ 複合体は、ビトロネクチン結合インテグリンおよび $\beta$ クラスインテグリンの間の明確な中間特異性を有しているようである。

3つの異なる $\alpha$ サブユニットが、1つ以上の $\beta$ サブユニットと会合することが示された。これらのうちの2つ、 $\alpha$ 、およ

BORATORY MANUAL (Barlow and Cole, 編) Cold Spring Harbor Laboratory (1988) を参照されたい。

また、 $\alpha, \beta_1$  レセプターは、インテグリンのリガンドの分析の分野でも有用である。そのようなリガンドの特異性は重要である。例えば、血小板インテグリン gp IIb/IIIa と結合するがその他のインテグリンとは結合しない、RGD配列を有する合成ペプチドが、抗血小板剤として開発されている。

$\alpha, \beta_1$  インテグリンと相互作用する化合物の能力は、実施例Ⅱに記載したように、アフィニティクロマトグラフィーによって評価し得る。試験細胞が有する他のインテグリンの寄与が排除できるならば、細胞接着アッセイは実施例Ⅲに記載したように使用され得る。最後に、酵素イムノアッセイフォーマットまたは放射線レセプターアッセイを、Hautanenら, J. Biol. Chem. 264:1347-1442 (1989); Gehlsenら, J. Biol. Chem. 264:19034-19038 (1989) に記載のように使用し得る。

以下の実施例は例示を目的としており、本発明の制限を意図するものではない。

#### 実施例Ⅰ

##### $\alpha, \beta_1$ インテグリンの同定

インテグリンサブユニットに対する抗体を、以下の表に示すように調製した。

ヒトの神経芽細胞 (Human neuroblastoma cells) (IMR 32; ATCC 受託番号 CCL 127)、肺細胞癌細胞 (lung cell fibroblasts) (WI-38; ATCC 受託番号 CCL 75)、例えば、(WI-38; ATCC 受託番号 CCL 757) およびグリア芽細胞腫細胞 (glioblastoma cells) (U251) は、本明細書では参考として援用する Pytelia ら, Cell 40:191-198 (1985) による <sup>125</sup>I およびラクトベルオキシダーゼで表面をラベルし、これを 0.5% トリトン X-100、150mM NaCl、1 μg/ml ロイペプチド、1 mg/ml アプロテニン、0.4 μg/ml ベプスタチンおよび 1.0 mM トリス、pH 7.2 を含む緩衝液で抽出した。インテグリンヘテロダイマーを、この  $\beta_1$  または  $\alpha$  サブユニットのいずれかに特異的な抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGE によって分析した。簡潔に述べると、この抽出物を、15,000rpm で遠心分離し、免疫前のラビットまたはマウス IgG-セファロースとともにインキュベートしてあらかじめ沈降させた。1 次抗体とのインキュベーション後、免疫複合体を、セファロース-プロテイン A またはセファロース-ヤギ抗マウス IgG のいずれかで明らかにした。

$\alpha$  含有インテグリンおよび  $\beta_1$  含有インテグリンを、それぞれ抗  $\alpha$  (Mab 147) および抗  $\beta_1$  (Mab LM 534) セファロースカラムで、WI-38 抽出物から免疫精製した。このカラムを、0.5% トリトン X-100 含有の 50mM グリシン-HCl pH 3 で抽出した。中和の後、この物質を、抗  $\beta_1$  抗体または抗  $\alpha$  抗体を用いる免疫沈降用に 3 つに分け、この免疫沈降物を、SD

び  $\alpha$  は、2 つのサブユニットのいずれとも結合しないことになり得る。 $\alpha$  サブユニットは、既に 4 つの  $\beta$  サブユニットと会合する能力が示されており、特に自由度が高いようだ。さらに、本明細書で述べた  $\alpha$  と  $\beta_1$  の間の会合は、予期し得ないことに、以前に提携された 2 つのインテグリンのクラスの境界と交わっている。これは現在認められているインテグリン分類の再評価を強いるものである。

コラーゲン、ラミンおよびフィブロネクチンのレセプターはすべて、共通の  $\beta$  サブユニットを共有しているので、 $\alpha$  サブユニットがインテグリンの特異性を決定すると言われていた。本明細書に記述した新しい  $\alpha, \beta_1$  インテグリンは、フィブロネクチンレセプターであるが、 $\alpha, \beta_1$  はビトロネクチンレセプターである。 $\alpha, \beta_1$  がフィブロネクチンと結合することが示されたこととこの結果は、 $\beta$  サブユニットが、レセプター特異性を決定するために従来考えられていたよりも大きな役割を担っていることを示している。

$\alpha, \beta_1$  は、細胞の細胞外マトリックスへの結合する能力のアッセイに有用である。即ち、細胞表面上の  $\alpha, \beta_1$  の存在はフィブロネクチンに結合する能力を示す。 $\alpha, \beta_1$  インテグリンの存在は、実施例Ⅰに記載したように各サブユニットに対する抗体を使用するイムノアッセイフォーマットで、またはそのイムノアッセイフォーマットの改変によって、検出される。このようなアッセイは、当業者には公知である。一般的には、本明細書では参考として援用する、ANTIBODIES: A LA

表1

サブユニット	宿主	モノクローナル または ポリクローナル	免疫原	参考文献または確認法
$\alpha$	マウス	モノクローナル Mab 147	構造ビトロネクチン レセプター	イムノプロット法: $\alpha$ , サブユニットと反応
$\alpha$	マウス	Mab 59	構造ビトロネクチン レセプター	イムノプロット法: $\alpha$ , サブユニットと反応
$\alpha$	ウサギ	ポリクローナル Go83	E K R V R P P Q E E - Q E R E Q L Q P H - E N G E G N S E T	Freed ら, EMBO J. 8:2955 (1989)
$\alpha$	ウサギ	ポリクローナル PIES	E K A Q L K P - P A T S D A	イムノプロット法: $\alpha$ , サブユニットと反応
$\alpha$	マウス	モノクローナル Go83	$\alpha$	Sonneberg ら, J. Biol. Chem. 263:14030 (1988)
$\alpha$	マウス	モノクローナル PIES	$\alpha$	Wagner and Carter J. Cell Biol. 103:1073 (1987)
$\alpha$	ウサギ	ポリクローナル	$\alpha$ , サブユニットの 細胞質ドメイン	Synes ら, J. Cell Biol. 105:409 (1989)
$\beta_1$	ウサギ	ポリクローナル LM 534	K K K E K E K E K M N - A K W D T G E N P - I Y S A V T T V V - N P K Y E G K	イムノプロット法: $\beta_1$ , サブユニットと反応
$\beta_1$	マウス	モノクローナル LM 442	構造フィブロネクチン レセプター	イムノプロット法: $\beta_1$ , サブユニットと反応

(以下省略)

S-PAGEによって、実質的に上述のよう分析した。それぞれの場合、 $\alpha$ 、および $\beta$ 、サブユニットの間の会合が見られた。

## 実施例 II

 $\alpha$ 、 $\beta$ 、インテグリンの

## リガンド特異性の分析および精製

IMR 32細胞を、表面を $^{125}$ Iでラベルし、200mM オクチルグルコシド、150mM NaCl、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、1  $\mu$ g/mlロイペプチド、1  $\mu$ g/mlアプロチニン、0.4  $\mu$ g/mlペプチダチニンおよび10mMトリス、pH7.2中で溶解した。この細胞抽出物を、110 kDフィブロネクチンフラグメントーセファロースカラムにかけ、このカラムを50mMオクチルグルコシド、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、150mM NaCl、および10mMトリス、pH7.2、単独で、および1 mg/ml G R G E S Pペプチドと共に洗浄した。このカラムを1 mg/ml G R G D S Pペプチドで抽出し、その後、10mM EDTAで抽出した。IMR 32細胞抽出物もまた、同じ方法で G R G D S P Kカラムで分画した。

これらの工程は、本明細書では参考として援用するPytelら、Meth. Enzymol. 144:475-489 (1987)；およびGailitおよびRuoslahti、J. Biol. Chem. 263:12927-12932 (1988)に記載されている工程と類似している。各カラムからの抽出物は、

1つの $\alpha$ および1つの $\beta$ ユニットを有するインテグリンを含んでいた。そのピークの割分をブールし、実施例 I に記載されている抗 $\beta_1$  (Mab LM 534) または抗 $\alpha_v$  (Mab 147) で、免疫沈降させた。このカラムに結合したインテグリンは、抗 $\alpha_v$ および抗 $\beta_1$ の両方で沈降することがわかった。これは、 $\alpha_v$ および $\beta_1$ サブユニットの会合を示している。

## 実施例 III

## 細胞粘着アッセイ

マイクロタイタブレートを、種々の濃度のフィブロネクチンおよびビトロネクチンでコートし、0.05%ウシ血清アルブミンでさらにコートした。洗浄した後、IMR 32 (ヒト神経芽細胞；ATCC CCL 127) またはMG-63 (ヒト骨肉腫；ATCC CCL 1427) 細胞をウェル当たり約10<sup>5</sup>ブレートし、90分間37°Cでインキュベートした。この接着した細胞を、3%パラホルムアルデヒドで固定し、0.5%クリスタルバイオレットで染色した。この接着物を、600nmの吸光度を読むことにより、定量した。図2に示すように、IMR 32細胞は、フィブロネクチンに接着し、ビトロネクチンまたはフィブリノーゲンには接着しなかったが、MG-63細胞は、3つのすべての基質に結合した。

本発明は好ましい実施態様を用いて記述されたが、種々の改変が、本発明の意図を変えることなくなされ得ることが理

解されるべきである。従って、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

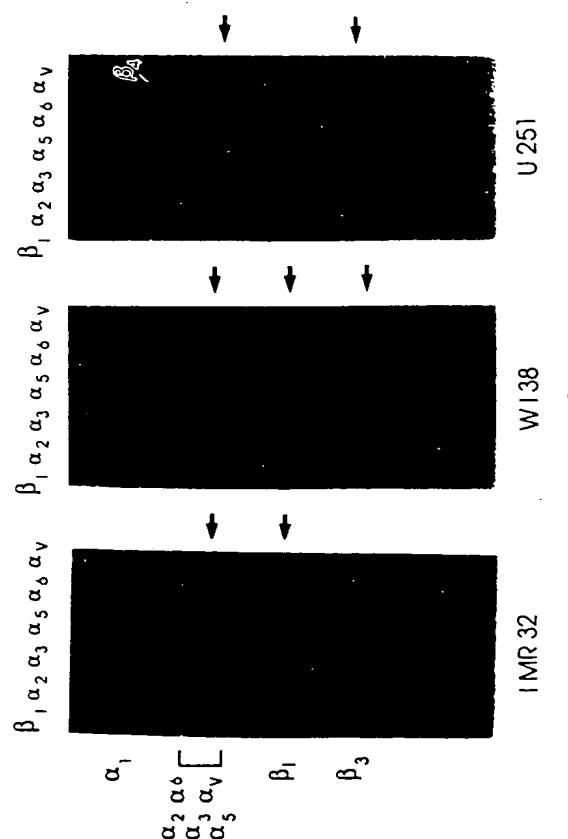


FIG. 1

W138

U251

IMR32

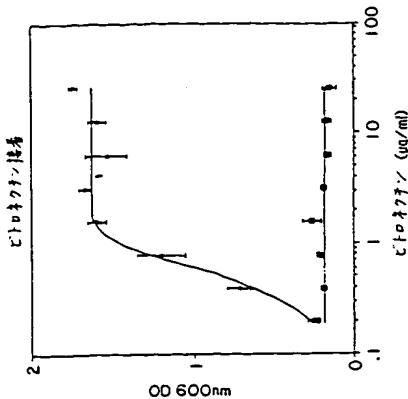


FIG. 2B

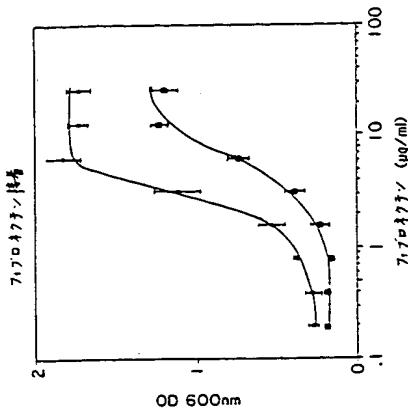


FIG. 2A

補正書の写し（翻訳文）提出書（特許法第184条の8）

## 請求の範囲

1. サブユニット  $\alpha_1$  および  $\beta_1$ 、またはそれらの免疫学的等価物を包含する、実質的に純粋な活性インテグリン。

2. フィブロネクチンおよび G R G D S P K と結合し、ピトロネクチンとは検出され得るほどには結合しないことによりさらに特徴付けられる、クレーム 1 に記載の実質的に純粋な活性インテグリンのレセプター。

3.  $\alpha_1, \beta_1$  インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物を分画する工程、該物質を G R G D S P K を含むカラムに通す工程、カラム上に保持された物質を溶出する工程、および、 $\alpha_1, \beta_1$  インテグリンを該溶出した物質から分離する工程、を包含する方法。

4.  $\alpha_1, \beta_1$  インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物をフィブロネクチンを含むカラムで分画する工程、カラム上に保持された物質を溶出し、該溶出物が該インテグリンを含んでいる工程、および  $\alpha_1, \beta_1$  インテグリンを該溶出した物質から分離する工程、包含する方法。

5.  $\alpha_1, \beta_1$  インテグリンの存在を検出する方法であって、該インテグリンを含むする疑いのあるサンプルに  $\alpha_1$  および  $\beta_1$

特許庁長官殿

平成4年7月3日

## 1. 特許出願の表示

PCT/US91/00048

## 2. 発明の名称

新規フィブロネクチンレセプター

## 3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037

ラ キヤ、ノース トレイ バインズ ロード  
10901名称 ラ キヤ キャンサー リサーチ  
ファウンデーション

## 4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー13階

氏名 (7828) 弁理士 山本秀策

電話 (大阪) 06-949-3910

## 5. 補正書の提出年月日

1991年12月13日

## 6. 添付書類の目録

(1)補正書の写し（翻訳文）



1通

## 国際通告

International Application No. PCT/US 91/00048

サブユニットに対する抗体を接触させる工程、および、該サブユニットに対する抗体の結合を検出する工程、を包含する方法。

6.  $\alpha, \beta$  インテグリンに対するリガンドの存在を検出する方法であって、該リガンドを含有する疑いのあるサンプルに  $\alpha, \beta$  インテグリンを接触させる工程、および、インテグリンに対する該リガンドの結合を検出する工程、を包含する方法。

I CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If more than one classification number apply, indicate all) According to International Patent Classification (IPC) or to their National Classifications and IPC IPC5: C 07 K 15/06		
II FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched <sup>1</sup> Classification System: Classification System		
IPCS	C 07 K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documentation is included in Fields Searched <sup>1</sup>		
III DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>2</sup>		
Category <sup>3</sup>	Criteria of Document <sup>4</sup> , with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>5</sup>	Relevant to Claim No. <sup>6</sup>
P,X	Dialog Information Services, File 154: Medline 85-91, Dialog accession no. 07295850, Bodary SC et al.: "The integrin beta 1 "subunit" associates with the vitronectin receptor alpha v, "subunit" to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line", & J Biol Chem Apr 15 1990, 265 (11) p5938-41 --	1,3-6
P,X	Dialog Information Services, File 55: Biosis 85-91, Dialog accession no. 7670156, Dedhar S et al.: "Isolation of a novel integrin receptor mediating arg-gly-asp-directed cell adhesion to fibronectin and type I collagen from human neuroblastoma cells association of a novel beta-1-related subunit with alpha-v", & J Cell Biol 110 (6), 1990, 2185-2194 --	1,3-6
<small><sup>1</sup> Special categories of cited documents:            "A" document referring to the general state of the art which is not specifically concerned with the subject-matter of the application            "B" earlier document not published on or after the international filing date            "C" document which may have priority on priority claim(s) or which may be cited in connection with a request for examination or other special reason (see column 4)            "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or sale made prior to the international filing date            "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claiming            "F" document published after the international filing date but earlier than the priority date claiming            "G" document member of the same patent family</small>		
IV CERTIFICATION		
Date or the Actual Commencement of the International Search	Date of Filing of the International Search Report	
22nd April 1991	14 MAY 1991	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authority Representative MISSY LAZLAAR	

International Application No. PCT/US 91/00048 (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category <sup>1</sup>	Criteria of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>2</sup>	Relevant to Claim No. <sup>3</sup>
P,A	Dialog Information Services, File 154: Medline 85-91, Dialog accession no. 07516653, Joseph LB et al.: "Characterization of Chinese hamster ovary cells with impaired spreading properties on fibronectin", & J Cell Sci (ENGLAND) Jul 1990, 96 (Pt 3) p519-26 --	1-6
A	Science, vol. 238, October 1987, Erkki Ruoslahti et al.: "New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins", see page 491 - page 497 the whole article --	1-6
A	Nature, vol. 309, May 1984, Michael D. Pierschbacher et al.: "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule", see page 30 - page 33 the whole article -- -----	1-6

## 第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5	識別記号	庁内整理番号
C 12 P 21/00	A	8214-4B
G 01 N 33/53	V	8310-2J
// C 12 N 15/06		
C 12 P 21/08		8214-4B
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

⑥発明者 タロネ, グイド	イタリア国 トリノ 10100 ストラーダ デル カンテーロ 9 /2
⑥発明者 ジヤンコツティ, フィリポ ジ	アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014 デル マール, フォー ス ストリート 201
⑥発明者 ボーゲル, ブルース イー.	アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122 サン デイエゴ, アバ ートメント 72 デコロ ストリート 4178